

L'iperomocisteinemia nell'insufficienza renale cronica: aspetti clinici, nutrizionali e tossicità

E. Satta, A.F. Perna, C. Lombardi, F. Acanfora, E. Violetti, M.M. Romano, R. Capasso, M. Pisano, F. Paduano, N.G. De Santo

I Divisione di Nefrologia, II Università degli Studi (SUN), Napoli

Hyperhomocysteinemia in chronic renal failure

Chronic renal failure (CRF) is frequently associated with increased plasma levels of homocysteine (Hcy), an amino acid that can be considered a new uremic toxin according to recent evidence. Studies on Hcy described first homocystinuria, an inherited disease characterized by high plasma Hcy levels and premature cardiovascular disease, resulting in high mortality rates. Hyperhomocysteinemia was then shown to be associated with cardiovascular events both in the general population and in CRF patients.

Hcy is a sulfur amino acid derived from dietary methionine, an essential amino acid. Methionine is condensed with ATP to form S-adenosylmethionine (AdoMet), the universal methyl donor in transmethylation reactions. The AdoMet demethylated product is S-adenosylhomocysteine (AdoHcy), which is the direct precursor of Hcy in vivo. Hcy is toxic for the endothelium, it enhances vascular smooth muscle cell proliferation, increases platelet aggregation, and acts on the coagulation cascade and fibrinolysis. Several mechanisms have been discussed to explain Hcy toxicity.

Hcy levels increase as renal function declines and progresses to ESRD; the causes of hyperhomocysteinemia are still unclear. Studies in humans show that renal metabolic extraction depends on renal plasma flow; in addition, an alteration of the extrarenal metabolic clearance, depending on uremic toxins, may occur. Among the consequences of hyperhomocysteinemia in renal failure are: impaired protein methylation, with altered protein repair processes; DNA hypomethylation, with an alteration in the allelic expression of genes regulated through methylation; and protein homocysteinylation.

Further, this review is dealing with the "reverse epidemiology" issue, outlining also the main Hcy-lowering strategies. (G Ital Nefrol 2006; 23: 480-9)

KEY WORDS: Homocysteine, Cardiovascular disease, Renal failure, Folate therapy

PAROLE CHIAVE: Omocisteina, Malattia cardiovascolare, Insufficienza renale cronica, Folati

Introduzione

La teoria che l'omocisteina (Hcy) sia un fattore di rischio cardiovascolare fu inizialmente proposta nel '69 da Kilmer McCully, un patologo statunitense. Egli descrisse le alterazioni vascolari presenti all'autopsia in due bambini affetti da omocistinuria, e propose che fossero gli elevati livelli di Hcy a determinare tali alterazioni (1). Infatti, si è poi dimostrato che l'iperomocisteinemia è il fattore comune a tutte le diverse forme di omocistinuria, a prescindere dal difetto genetico di base, che può variare. Nel 1976, Wilcken e Wilcken fornirono la prima evidenza della presenza di un'associazione con iperomocisteinemia lieve e moderata in pazienti vasculo-

patici (2). Studi epidemiologici prospettici e retrospettici apparsi successivamente hanno portato a concludere che anche un modesto aumento dell'Hcy sia un fattore di rischio indipendente per malattia coronarica, malattia cerebrovascolare, tromboembolismo venoso, oltre che per i difetti del tubo neurale, infarti della placenta, malattia di Alzheimer. In una recente metanalisi, che includeva 30 studi comprendenti più di 6000 eventi, una riduzione dell'omocisteinemia del 25% rispetto alla norma era associata ad un rischio di ischemia coronarica minore del 11% e ad un rischio di ictus minore del 19% (3). I dati erano normalizzati per il *bias* dovuto alla regressione-diluizione, e per i fattori di rischio più noti. Gli Autori concludono che pur essendo l'iperomocisteinemia un fattore di

rischio apparentemente modesto, ridurre i livelli di omocisteina nel sangue può avere comunque implicazioni notevoli per la popolazione generale. Infatti, l'esempio dato da alcuni polimorfismi presenti comunemente, che si associano ad un aumento del rischio cardiovascolare, dimostra che un basso introito di folati con la dieta, unito alla presenza del polimorfismo, può aumentare notevolmente il rischio (4).

Sono attualmente in corso numerosi studi di intervento nella popolazione generale che dovrebbero aiutare a dirimere la *vexata questio* se l'omocisteina sia effettivamente un fattore causale o un semplice *marker*, un *innocent bystander*, nello sviluppo della malattia cardiovascolare. Sono già disponibili i risultati relativi ad alcuni studi d'intervento secondario, in pazienti con ictus (5), ed anche, in forma di *abstract*, in pazienti con infarto del miocardio (http://www.escardio.org/knowledge/OnlineLearning/slides/ESC_Congress_2005/BonaaFP1334/). Tali studi sono negativi, nel senso che non sono a favore dell'ipotesi causale, perché la terapia con folati non si associa ad una riduzione del rischio di ripetere l'evento. C'è da precisare però che il disegno di tali studi è soggetto a numerose critiche da parte di epidemiologi esperti (www.dach-liga-homocysteine.org). Inoltre, è chiaro che le informazioni ottenute in pazienti già compromessi dal punto di vista cardiovascolare, rende comunque difficile stabilire delle inferenze sia per quanto riguarda il nesso di causalità che per l'efficacia di un terapia. Ci si attende per il maggio 2007 i risultati preliminari del FAVORIT, uno studio d'intervento effettuato in pazienti trapiantati di rene, da cui sarà probabilmente possibile avere risultati più affidabili, poiché lo studio prevede un lungo *follow-up* ed è su larga scala (6).

Una delle patologie attualmente più studiate dove l'Hcy rappresenta un fattore di rischio cardiovascolare è l'insufficienza renale cronica (IRC).

I pazienti uremici hanno un tasso di mortalità per malattie cardiovascolari che è di circa 30 volte più elevato rispetto alla popolazione generale (il rischio varia a seconda della fascia di età considerata). Questa condizione non può essere interamente spiegata dai comuni fattori di rischio tradizionali (ipercolesterolemia, ipertensione, fumo, diabete, ecc) o da quelli tipici dell'uremia (iperparatiroidismo, anemia, ipoalbuminemia ecc). Da qui l'interesse della comunità scientifica per altri fattori di rischio, come l'iperomocisteinemia.

L'iperomocisteinemia è anche il fattore di rischio cardiovascolare a più elevata prevalenza: si riscontra nel 90-95% dei casi di IRC (7).

Metabolismo dell'Hcy

L'Hcy è un amminoacido solforato, posto al crocevia di una via metabolica piuttosto complessa. All'inizio di questa via troviamo la metionina (Fig. 1).

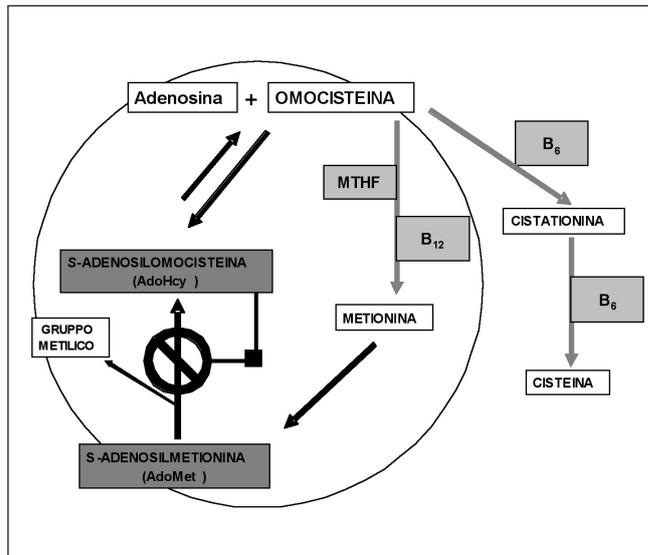


Fig. 1 - Metabolismo dell'omocisteina (Hcy). L'Hcy è un amminoacido solforato, che deriva dall'amminoacido essenziale metionina. La metionina viene prima condensata con l'ATP a formare S-adenosilmetionina (AdoMet) che viene utilizzata come donatore di metili nelle reazioni di transmetilazione. Dal prodotto demetilato, S-adenosilomocisteina (AdoHcy), si origina attraverso una reazione di idrolisi Hcy ed adenosina. Se l'Hcy si accumula, l'idrolisi viene rallentata e viene favorita la formazione di AdoHcy. L'Hcy che deriva dalla reazione di idrolisi, a sua volta è metabolizzata attraverso due vie: la transsulfurazione e la rimetilazione. La transsulfurazione rappresenta una via dipendente dalla vitamina B₆ con produzione di cistationina come prodotto finale. La seconda via, cioè la rimetilazione, richiede l'enzima metiltetraidrofolato-Hcy metiltransferasi o metionina sintasi e porta alla sintesi di metionina. Cofattori di questa reazione sono la vitamina B₁₂ e i folati nella forma attiva (metiltetraidrofolato o MTHF).

La metionina è un amminoacido essenziale, che deriva dalla dieta o dal catabolismo proteico. Essa, quando non è utilizzata nella sintesi *ex novo* delle proteine, può essere condensata enzimaticamente con l'ATP, per formare il nucleoside S-Adenosilmetionina (AdoMet). L'AdoMet è un composto di solfonio che dona un gruppo metilico a numerosi composti metil-accettori, nelle cosiddette reazioni di transmetilazione. Queste reazioni sono catalizzate da più di 40 enzimi che agiscono su substrati diversi: piccole molecole come la fosfatidiletanolamina e la dopamina, macromolecole come le proteine, il DNA e l'RNA (8). Le reazioni di transmetilazione hanno molte funzioni importanti: sono coinvolte per esempio nella detossificazione di sostanze endogene ed esogene, nella biosintesi dei fosfolipidi, nella biosintesi e nel metabolismo di neurotrasmettitori ed ormoni.

La metilazione del DNA influisce su processi come la regolazione della trascrizione genica, la struttura della cromatina, la genesi dei tumori; la metilazione delle proteine è invece implicata, tra le altre funzioni, nella riparazione di proteine di membrana danneggiate dalla presenza di residui L-isoaspartilici (9).

Il prodotto demetilato dell'AdoMet è l'S-Adenosilomo-

cisteina (AdoHcy), il quale rappresenta un inibitore naturale delle reazioni di transmetilazione (10). L'AdoHcy si idrolizza ad Hcy ed adenosina, in una reazione reversibile catalizzata dall'AdoHcy-idrolasi. Se l'Hcy si accumula, la suddetta idrolisi viene rallentata, e viene favorita la formazione di AdoHcy. L'Hcy, una volta formata, può seguire due vie: la via della transsulfurazione e la via della rimetilazione. La prima rappresenta una via dipendente dalla vitamina B₆, ed attraverso la cistationina-, -sintetasi (CBS) si forma la cisteina. La seconda via (rimetilazione) porta alla sintesi di metionina dall'Hcy. L'Hcy riceve un gruppo metilico dal metiltetraidrofolato (MTHF), in una reazione catalizzata dall'enzima MTHF-Hcy-metiltransferasi o metionina-sintasi.

Cofattori di questa reazione sono la vitamina B₁₂ ed i folati nella forma attiva: l'MTHF, che rappresenta anche la forma circolante. Quest'ultimo si forma a partire dal metilene-tetraidrofolato per riduzione enzimatica catalizzata dalla metilene-tetraidrofolato-reduttasi (MTHFR).

Iperomocisteinemia: definizione

I livelli normali di omocisteinemia sono compresi tra 8 e 10 µM nelle femmine e tra 10 e 12 µM nei maschi. La condizione di iperomocisteinemia è considerata **lieve** se i valori sono >12 fino a 15 µM, **moderata** se sono >15 fino a 30 µM, **intermedia** se sono > 30 fino a 100 µM, grave se sono > di 100 µM (11). Questi ultimi sono tipici dell'omocistinuria non trattata.

I livelli di Hcy, nell'IRC e nell'uremia, sono in media nella *range* moderato-intermedio, cioè tra 20 e 40 µM, in particolare se non vengono somministrati folati. In alcuni pazienti abbiamo osservato anche valori molto più elevati di Hcy (> 100), simili a quelli degli omocistinurici.

Nell'organismo umano, l'Hcy plasmatica è legata alle proteine per almeno l'80-90% attraverso la formazione di un ponte disolfuro con i residui di cisteina delle proteine. L'Hcy plasmatica totale viene definita come la somma dell'Hcy legata alle proteine e di quella libera (Hcy libera, omodimero Hcy-Hcy e dimero Hcy-cisteina).

Test di verifica

1) L'omocisteina è:

- Un carboidrato
- Un lipide
- Un amminoacido sulfidrilico
- Una poliammina
- Un dipeptide

2) L'Hcy plasmatica nell'organismo umano si trova in forma:

- Tutta libera
- Tutta legata a proteine

- Libera per il 90%
- Legata per il 30%
- Legata a proteine per l'80-90%

3) Livelli elevati di Hcy plasmatica nella popolazione generale si associano a:

- Aumento del fabbisogno di ferro
- Aumento del rischio cardiovascolare
- Calcificazioni vascolari
- Disfunzione erettile
- Aritmie cardiache.

La risposta corretta alle domande sarà disponibile sul sito internet www.sin-italy.org/gin e in questo numero del giornale cartaceo dopo il Notiziario SIN

Omocistinuria ed altre cause di iperomocisteinemia

L'omocistinuria è una rara malattia ereditaria, ed il primo esempio umano descritto di iperomocisteinemia (1).

Questa malattia è legata a difetti enzimatici che compromettono o la via della transsulfurazione o la via della rimetilazione, comportando livelli di Hcy nel sangue che possono arrivare anche a 400 µM a digiuno, ed un'aumentata escrezione urinaria di omocistina, il prodotto ossidato (Hcy-Hcy). Infatti, la quota di Hcy non legata si ossida facilmente formando disolfuri in cui partecipa il gruppo -SH libero, che si può combinare, ad esempio, con un'altra molecola di Hcy dando origine all'omocistina. Quest'ultima, quando i livelli di Hcy sono molto elevati, si ritrova nelle urine. I difetti genetici possibili comportano un *deficit* o della CBS, o della metionina sintasi, o della MTHFR; il primo difetto è il più comune, ed è accompagnato da ipermetioninemia. Negli altri difetti, vi è solo iperomocisteinemia, senza ipermetioninemia. I bambini affetti da questa patologia hanno le caratteristiche somatiche tipiche della sindrome di Marfan, tanto che la patologia fu inizialmente classificata tra le malattie del tessuto connettivo. Il quadro clinico si caratterizza per il coinvolgimento multisistemico. Oltre allo scheletro (osteoporosi, arti lunghi e sottili, aracnodattilia, deformità ossee), anche

TABELLA I - POSSIBILI STRATEGIE TERAPEUTICHE

- FOLATI
- VITAMINE B₆, B₁₂
- N-ACETILCISTEINA
- SERINA, BETAINA
- DIALISI PIU EFFICIENTE (SUPERFLUSSO, DIALISI NOTTURNA)

Nella Tabella sono elencate le possibili strategie terapeutiche, atte a normalizzare i livelli di Hcy nei pazienti con IRC.

l'occhio è interessato (sublussazione del cristallino), con iridodonesi (iride tremolante). I piccoli pazienti mostrano, inoltre, anomalie elettroencefalografiche, e ritardo mentale. Infine, il sistema cardiovascolare è coinvolto da eventi tromboembolici ed aterosclerotici precoci. I pazienti non trattati muoiono in età giovanile (prima dei 30 anni) per accidenti cardiovascolari: trombosi arteriosa e/o venosa, infarto del miocardio, *stroke*. La terapia (con betaina, o con vitamina B₆ e folati) porta alla riduzione dei livelli di omocisteina, spesso però senza normalizzazione, e alla riduzione della mortalità per eventi cardiovascolari. L'iperomocisteinemia, quindi, in questo caso è causata da mutazioni dei geni che codificano per gli enzimi chiave del metabolismo dell'Hcy.

Alcune mutazioni, diverse da quelle che portano all'omocistinuria, possono portare ad iperomocisteinemia. Per esempio, la mutazione rappresentata dalla transizione C677T (C al posto di T in posizione 677) dell'enzima MTHFR, in omozigosi, porta ad un forma "termolabile" dell'enzima. Questo polimorfismo è particolarmente frequente (omozigosi TT, 10-20%, eterozigoti 20-40%), ed è responsabile di iperomocisteinemia di grado lieve-medio (12, 13). Inoltre, l'associazione con una maggiore frequenza di eventi cardiovascolari è stata recentemente dimostrata (4).

L'iperomocisteinemia può essere causata anche da fattori nutrizionali; un deficit relativo o assoluto di folati, vitamine B₆, e B₁₂ nella dieta può indurre un accumulo di Hcy per inefficienza della rimetilazione e/o della transsulfurazione. Tale deficit si può verificare per inadeguato apporto di carne e vegetali a foglia verde (spinaci), cibo troppo cotto (i folati sono termolabili), o ridotto assorbimento intestinale. L'iperomocisteinemia può essere causata, inoltre, dalla somministrazione di alcuni farmaci (L-dopa, methotrexate, contraccettivi, ecc), e dall'IRC.

Cause di iperomocisteinemia nell'insufficienza renale

I valori di Hcy aumentano quando la funzione renale declina e progredisce verso l'uremia (14). Nell'IRC l'iperomocisteinemia comincia ad apparire quando il filtrato glomerulare scende al di sotto di 70 mL/min.

Ma quali sono le cause di iperomocisteinemia nell'insufficienza renale? Teoricamente, le cause di un aumento di Hcy potrebbero essere ricondotte ad: 1) Aumentata produzione; 2) Ridotto metabolismo; 3) Ridotta escrezione. Quest'ultima ipotesi potrebbe anche essere esclusa, considerando che l'escrezione di Hcy è trascurabile (15). L'Hcy libera, cioè non legata a proteine, nell'organismo umano è pari a circa 3.0 µM, cosicché per un GFR normale di 180 L/die l'Hcy filtrata risulta essere circa 540 µmoli/die; la maggior parte dell'Hcy filtrata viene riassorbita a livello tubulare e la quantità escreta nelle urine è di solo 6 µmoli/die (1%) (16).

Considerando, invece, la prima ipotesi cioè l'incrementata produzione, è assodato che l'Hcy si forma dall'idrolisi dell'AdoHcy, il prodotto demetilato dell'AdoMet, il donatore dei metili nelle reazioni di transmetilazione. Tuttavia, l'accumulo dell'Hcy porta ad una rallentata idrolisi con l'incremento del suo precursore AdoHcy ed un'inibizione delle transmetilazioni. In particolare, sono inibite alcune metiltransferasi come ad esempio, quella che interviene nella metilazione del DNA, e quella responsabile della riparazione del danno proteico rappresentato dalla presenza di residui L-isoaspartilici. Altre metiltransferasi non dovrebbero essere inibite (sono state calcolate, in base alle costanti di inibizione, le percentuali relative) (17); in particolare quella che catalizza la reazione di formazione di creatina dal guanidinoacetato. Il nostro gruppo ha dimostrato, e successivamente è stato confermato da Loeher et al, e Van Guldenen et al, che l'inibizione delle metilazioni è presente nell'IRC e nell'uremia (18, 19).

Nel 1980, Mitch et al. somministrando creatinina radiomarcata endovena a soggetti con IRC severa, dimostrarono che la produzione di creatinina era in media di 150 µmoli/kg/giorno, cioè simile alla produzione dei soggetti normali (20). Guttormsen et al. che il flusso netto di Hcy nel plasma è lo stesso sia nei controlli che nei pazienti con insufficienza renale (21). Stam et al. usando una tecnica di spettrometria di massa che utilizzava un isotopo stabile hanno dimostrato che le transmetilazioni, *in toto*, sono ridotte, come anche la *clearance* dell'Hcy, nell'organismo dei pazienti con IRC (22).

Quindi, si potrebbe affermare che nell'uremia alcune metiltransferasi sono inibite dall'AdoHcy, mentre altre sono inibite solo modicamente o affatto. AdoHcy ed Hcy continuano ad essere prodotte da queste ultime metiltransferasi, conducendo ad un accumulo di AdoHcy ed innescando un circolo vizioso. Concludendo, ad oggi, si può dire che gli studi sono a favore dell'ipotesi che non vi sia un'incrementata produzione di Hcy nell'uremia.

L'ipotesi più plausibile, a questo punto degli studi, è una riduzione della rimozione di Hcy da parte del rene o di altri organi. Nel ratto l'estrazione renale, e cioè la differenza artero-venosa di Hcy è del 20%. Tuttavia, nel ratto l'Hcy è

TABELLA II - PROTOCOLLI CONSIGLIATI

- | |
|--|
| 1) ACIDO FOLICO (15 MG/DIE per os) (BOSTOM ET AL. CIRCULATION 2000; 101: 2829) |
| + VITAMINA B ₆ (50 MG/DIE) |
| + VITAMINA B ₁₂ (1 MG/DIE) |
| 2) MTHF (15 MG/DIE per os) (INGROSSO ET AL. LANCET 2003; 361: 1693) o ev alla fine della dialisi (35 mg) |
| + VITAMINA B ₆ (50 MG/DIE) |
| + VITAMINA B ₁₂ (0.5 MG/DIE) |

Descrive due possibili protocolli. L'Hcy andrà misurata prima e dopo due mesi di terapia, che può essere effettuata a cicli durante l'anno.

presente prevalentemente in forma libera, a differenza di quanto avviene nell'uomo. Gruppi di ricerca indipendenti hanno dimostrato che non c'è differenza nella concentrazione di Hcy tra arteria e vena renale negli esseri umani (19, 23). Tuttavia questo non esclude la possibilità che il rene metabolizzi l'Hcy. Infatti, in tali studi il coefficiente di variazione è piuttosto alto, per cui differenze importanti potrebbero risultare non significative all'indagine statistica e dunque essere sottovalutate; inoltre, tali studi sono stati effettuati a digiuno, e non ci dicono nulla per quanto riguarda ciò che succede dopo un pasto.

La filtrazione glomerulare dell'Hcy è limitata a causa del legame dell'Hcy con le proteine; tuttavia, l'Hcy potrebbe anche essere rimossa attraverso l'*uptake* peritubulare. Per "*uptake peritubulare*" si intende il trasporto di amminoacidi, peptidi e proteine nei capillari arteriolari che provengono dall'arteriola efferente. Tali composti entrano nelle cellule tubulari dove possono essere secrete nel lume tubulare, o rimanere nelle cellule tubulari ed essere lì metabolizzati.

Alcuni studi di Garibotto et al sono a supporto di quest'ultimo concetto. Essi dimostrano che la frazione di estrazione renale dell'Hcy è correlata positivamente al flusso plasmatico renale, con un *uptake* netto quando il flusso plasmatico renale è al di sopra di 500 mL/min. Inoltre, essi dimostrano che la *clearance* renale dell'Hcy correla con il flusso plasmatico renale, cioè, la *clearance* dell'Hcy si azzera quando il flusso plasmatico renale si riduce (23). Concludendo, sicuramente vi è una riduzione del metabolismo renale o extrarenale dell'Hcy nell'IRC, ma le cause non sono ancora chiare. In questo quadro potrebbe essere importante, ad esempio, un possibile ruolo svolto dalle tossine uremiche nell'inibire il metabolismo a livello epatico dell'Hcy.

Test di verifica

1) L'omocistinuria è causata da:

- Dieta carente di folati
- Dieta carente di vitamina B
- Difetti ereditari di enzimi coinvolti nel metabolismo dell'Hcy
- IRC
- Condizione di omozigosi per la transizione C677T della metilene-tetraidrolato riduttasi

2) I pazienti con omocistinuria si presentano con:

- Sublussazione del cristallino
- Ritardo mentale
- Osteoporosi
- Tromboembolie
- Tutte le precedenti

3) Quale composto "dona" un gruppo metilico nelle reazioni di transmetilazione:

- Hcy
- Metionina
- AdoMet

- AdoHcy
- Nessuno dei precedenti

4) Le cause dell'iperomocisteinemia nell'insufficienza renale sono:

- Deficit di escrezione urinaria
- Inadeguato metabolismo (renale o dell'organismo in toto)
- Aumento della produzione
- Difetto di secrezione tubulare
- Malnutrizione.

La risposta corretta alle domande sarà disponibile sul sito internet www.sin-italy.org/gin e in questo numero del giornale cartaceo dopo il Notiziario SIN

Possibili conseguenze e meccanismi di tossicità dell'iperomocisteinemia nell'uremia

Diversi studi hanno provato che l'Hcy interviene in molti dei meccanismi coinvolti nei processi aterosclerotici. L'Hcy può danneggiare le cellule endoteliali, e promuovere la proliferazione delle fibrocellule muscolari lisce. Essa incrementa l'aggregazione piastrinica; attiva i fattori della coagulazione, come il V, il X ed il XII; inoltre, induce una riduzione dell'attivazione della proteina C e della trombo-modulina, creando perciò un ambiente protrombotico. Inoltre, a parte gli effetti diretti dell'Hcy, dovuti alla reattività della stessa molecola, è possibile riconoscere degli effetti indiretti, mediati cioè da metaboliti o precursori di essa (AdoHcy).

A partire dal 1990 il nostro gruppo di ricerca ha focalizzato l'attenzione su un particolare aspetto della tossicità dell'Hcy: l'ipometilazione. Come già enunciato, l'accumulo di AdoHcy, il precursore *in vivo* dell'Hcy, che avviene quando i livelli di Hcy sono aumentati, comporta un'inibizione delle reazioni di transmetilazione, con diverse importanti conseguenze: aumento del contenuto dei residui L-isoaspartilici nelle proteine, alterazione dell'espressione genica a carico dei geni regolati dalla metilazione, omocisteinilazione delle proteine.

In particolare, abbiamo osservato, a carico delle proteine della membrana eritrocitaria in pazienti uremici cronici in emodialisi, un'inibizione della transmetilazione catalizzata dalla proteina-carbossi-metiltransferasi (PCMT), un enzima implicato nella riparazione dei residui L-isoaspartilici (24). Questi residui danneggiati originano da residui di asparagina o acido aspartico deamidati/isomerizzati, che normalmente possono essere riparati attraverso una reazione di metilazione. Questa reazione è inibita nell'uremia, e negli eritrociti, l'inibizione dipende dall'accumulo di AdoHcy (24). Anche nel plasma si è osservato un accumulo di residui isoaspartilici a carico delle proteine. Tale

danno può solo parzialmente essere revertito da una terapia con folati, che abbassa i livelli di Hcy. È stato così postulato un ruolo per altre tossine uremiche nell'elicitare tale tipo di danno (25). È stato poi dimostrato che nella patogenesi di quest'alterazione sono coinvolte diverse tossine del "milieu uremico". Recentemente, abbiamo, infatti, studiato l'effetto di diverse tossine uremiche nell'indurre danno molecolare a carico delle proteine plasmatiche, *in vitro*, riuscendo ad evidenziare che alcune tossine, e soprattutto la guanidina, inducono un incremento di residui L-isoaspartilici. La guanidina determina un effetto dose-risposta. Abbiamo studiato inoltre il danno proteico prima e dopo una seduta emodialitica, senza trovare differenze significative. Se l'albumina viene deamidata *in vitro*, il procedimento comporta una diminuzione della capacità di legame per l'Hcy (26). Quindi, il danno molecolare rappresentato dai residui isoaspartilici, e dovuto sia all'Hcy che ad altre tossine uremiche, può causare anche effetti funzionali.

Oltre alla metilazione delle proteine, anche la metilazione del DNA totale è ridotta nei pazienti in emodialisi ed i livelli di ipometilazione correlano significativamente con l'Hcy plasmatica. Molti geni sono regolati attraverso la metilazione. In particolare, la metilazione del DNA è vista come un meccanismo che può silenziare (o più in generale regolare, perché vi sono alcuni geni che invece possono essere attivati) l'espressione genica, come nel caso dei "geni imprintati". In questi ultimi, nel passaggio da una generazione all'altra, l'allele materno o paterno viene silenziato, cioè represso, in modo *non-random*, in modo non casuale, attraverso la metilazione.

L'SYBL1 è un tipico esempio di gene imprintato, la cui normale espressione è monoallelica; nei pazienti uremici iperomocisteinemici, l'espressione di questo gene diventa biallelica, cioè entrambi gli alleli, sia il materno che il paterno, sono espressi. Anche l'H19 è un gene regolato attraverso la metilazione; la sua normale espressione è monoallelica, ma nei pazienti con elevati livelli di Hcy (> 50 μ M) diventa biallelica. Dopo terapia con folati, per due mesi, la metilazione totale del DNA viene riportata alla norma, in parallelo con un decremento dei livelli di Hcy, e l'espressione genica ritorna monoallelica (27).

Un altro meccanismo di tossicità dell'Hcy consiste nella formazione di proteine omocisteinilate. L'omocisteinilazione delle proteine si produce o attraverso l'acilazione post biosintetica dei gruppi amminici liberi (N-omocisteinilazione mediata dall'Hcy tiolattone); oppure attraverso la formazione di ponti disolfuro con i residui di cisteina delle proteine (S-omocisteinilazione). È stata dimostrata, in varie proteine modello, come conseguenza dell'omocisteinilazione, una riduzione dell'attività enzimatica ed una ridotta mobilità elettroforetica, fino alla denaturazione (28).

Nel nostro laboratorio abbiamo misurato l'omocisteinilazione delle proteine in un gruppo di pazienti in emodialisi paragonato ad un gruppo di controlli con una nuova meto-

dica, comprendente uno *step* di riduzione delle proteine, gel filtrazione e derivatizzazione dell'Hcy. Il campione idrolizzato chimicamente, viene poi analizzato mediante separazione cromatografica per HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) su colonna in fase inversa.

L'Hcy plasmatica è significativamente più alta nei pazienti in emodialisi; inoltre, sia l'omocisteinilazione rappresentata dal legame ammidico, che quella data dal ponte disolfuro sono risultate significativamente aumentate. L'Hcy plasmatica, e l'omocisteinilazione data dal legame con il ponte disolfuro, correlano significativamente sia nei pazienti che nei controlli. L'omocisteinilazione rappresentata dal legame ammidico non correla in modo significativo, probabilmente perché la formazione del legame ammidico è soggetta all'influenza di differenti variabili, come quella dovuta all'attività della tiolattoneasi, che sembrerebbe ridotta nei pazienti con IRC. Due mesi di terapia con folati riducono significativamente sia l'omocisteinilazione data dal ponte disolfuro, sia l'omocisteinilazione rappresentata dal legame ammidico (29).

L'epidemiologia inversa

Di recente, alcuni Autori hanno proposto che la cosiddetta teoria dell'"epidemiologia inversa" si applica anche all'iperomocisteinemia, oltre che all'ipercolesterolemia, e ad altri fattori di rischio, nell'uremia. E cioè, hanno osservato la presenza di una correlazione positiva, invece che negativa, tra bassi livelli di Hcy ed incremento della mortalità.

Per esempio, Kalantar-Zadeh et al. hanno indicato che la sopravvivenza diminuisce quando i livelli di Hcy sono bassi (30). Sfortunatamente, essi non hanno corretto i dati per i livelli di albumina. Inoltre, in questo studio, più della metà dei pazienti era diabetico (ed il 75% dei pazienti deceduti era diabetico). Questo è importante nell'interpretazione dei dati, perché è stato visto che i soggetti diabetici hanno valori di Hcy più bassi, persino se uremici (31).

Wrona et al. hanno paragonato tre gruppi di pazienti (che già assumevano 1 mg di acido folico) con tre diversi dosaggi di acido folico (1, 5, 15 mg/die) e non hanno trovato differenze significative riguardo agli eventi cardiovascolari, dopo due anni (32). Inoltre, i valori più bassi di Hcy all'inizio dello studio erano un fattore predittivo di mortalità. In questo *trial*, non è stato dunque utilizzato il placebo, ed è quindi difficile compiere delle deduzioni che riguardano l'effetto della terapia sugli eventi cardiovascolari: il trattamento stesso, a prescindere dal dosaggio, potrebbe avere degli effetti sugli eventi. Inoltre, quando la correzione per i livelli di albumina veniva effettuata, "l'epidemiologia inversa" scompariva (32), e rimanevano come predittori significativi di mortalità solo l'età, ed il gruppo etnico di appartenenza.

Livelli più bassi dell'amminoacido Hcy rispetto a quelli

degli uremici in generale potrebbero essere dovuti a due condizioni: 1) un ridotto *pool* di aminoacidi, conseguenza della malnutrizione, un fattore che, come l'ipoalbuminemia, influenza la mortalità in modo potente; 2) oppure, se vi è ipoalbuminemia, si realizza un *deficit* del *binding* dell'Hcy all'albumina. La capacità di *binding* dell'albumina è però relativamente elevata (33), così anche se i livelli di albumina sono bassi, essa può comunque legare una grande quantità di Hcy, e quindi, a nostro avviso, questa possibilità è meno attraente.

In conclusione, sarebbe opportuno attendere i risultati di studi prospettici e d'intervento che tengano conto di importanti fattori confondenti, quali lo *status* nutrizionale ed i livelli di albumina, prima di raggiungere conclusioni potenzialmente molto azzardate, come per esempio che per aumentare l'aspettativa di vita dei pazienti in dialisi sia necessario mantenere i livelli di Hcy nel *range* medio-alto.

Terapia

In generale, le Linee Guida dell'American Heart Association, della Società Italiana di Nefrologia, e dell'ERA-EDTA non consigliano di effettuare lo screening o di trattare l'iperomocisteinemia nell'insufficienza renale (o nella popolazione generale), questo in attesa degli studi d'intervento che attestino che ridurre i livelli di Hcy comporti un beneficio dal punto di vista della mortalità cardiovascolare. Tuttavia, si consiglia di dosare l'Hcy e di trattare l'iperomocisteinemia in pazienti con elevato rischio cardiovascolare, per es. con familiarità o con un pregresso evento.

Sebbene alcuni studi abbiano osservato una relazione inversa tra iperomocisteinemia e malattia cardiovascolare (vedi sezione precedente), i dati di tre studi prospettici in pazienti con IRC hanno portato ad una stima del rischio relativo per malattia cardiovascolare dovuto ad iperomocisteinemia di 2.8 (intervallo di confidenza al 95%, 1.6 a 5.0) (34). In considerazione dunque dei dati epidemiologici e dell'elevata frequenza di eventi cardiovascolari nei pazienti con insufficienza renale, diversi studi sono stati effettuati nel tentativo di ridurre l'Hcy in questi pazienti.

Nella popolazione generale, è sufficiente la dieta (vegetali a foglia verde, ceci, agrumi) o una modesta supplementazione di folati (0.4-0.8 mg) per normalizzare i livelli di Hcy. Inoltre, negli USA e nel Canada, dal 1998 è già obbligatoria la supplementazione dei cereali e delle farine con folati, non per prevenire la malattia cardiovascolare, ma in una strategia di prevenzione dei difetti del tubo neurale (35).

Anche nei pazienti con IRC o trapiantati è spesso possibile ridurre e/o normalizzare i livelli di Hcy, nello stesso modo che nella popolazione generale o ricorrendo ai folati a dosaggio medio (5 mg). Nei pazienti in dialisi, non è possibile ridurre i livelli di Hcy in modo siffatto, da una parte perché gli alimenti contenenti folati spesso contengono

potassio in quantità tali da non poter essere raccomandati dal punto di vista dietetico, dall'altra perché i folati a basso dosaggio sono completamente inefficaci.

Nei pazienti in dialisi le possibilità terapeutiche sono: i cofattori rappresentati dalle vitamine B₆ e B₁₂; i cosubstrati quali i folati, la serina, la betaina, l'N-acetilcisteina; dialisi più efficiente, ed il trapianto (Tab. I).

L'acido folico è utilizzato come mezzo per favorire la reazione di rimetilazione dell'Hcy a metionina. Gli uremici rappresentano però una popolazione piuttosto resistente alla terapia con folati. Infatti, è possibile normalizzare i livelli di Hcy solo in una minoranza di pazienti, mentre la maggior parte di essi mostra una riduzione, anche consistente (più alti sono i livelli basali, maggiore sarà la risposta), senza però normalizzazione. È comunque opinabile se sia necessaria o meno la completa normalizzazione dei livelli di Hcy, giacché i pazienti omocistinurici dopo terapia hanno un'aspettativa di vita pressoché normale, anche se i livelli di Hcy si riducono, senza normalizzarsi (36). La resistenza ai folati si realizza anche quando i folati sono utilizzati ad alto dosaggio, come è stato dimostrato nello Studio Multicentrico di Vienna. In questo *trial* randomizzato e controllato, gli Autori hanno paragonato trattamenti con acido folico a diversi dosaggi (15, 30, 60 mg/die), e non ci sono state differenze significative tra i diversi gruppi di trattamento, in termini di riduzione dell'Hcy plasmatica. Si è giunti così alla conclusione che utilizzare folati ad un dosaggio >15 mg non sia necessario (37).

I folati sono presenti in diverse forme chimiche, dalle meno ridotte (acido folico, acido folinico), alle più ridotte rappresentate dal MTHF, che rappresenta la forma attiva circolante. Non ci sono differenze significative, in termini di efficacia, tra le diverse forme (38). La forma attiva, MTHF, può essere utilizzata, però, per eludere le conseguenze dovute all'eventuale presenza della variante termolabile del MTHFR, che è rappresentata nei pazienti uremici in una percentuale non diversa da quella della popolazione generale. L'MTHF consente di aggirare il blocco dovuto alla presenza della variante termolabile, ed è quindi una forma immediatamente disponibile.

Riguardo ai rischi inerenti alla terapia con folati, è da menzionare un ben definito effetto mascherante dei folati sulle anormalità ematologiche (megaloblastosi), che si manifestano qualora si manifestasse anemia perniziosa, per cui la diagnosi di anemia potrebbe essere rimandata alla scoperta delle complicanze neurologiche tardive e più gravi (39). È stato dunque proposto che assieme ai folati vada aggiunta anche una piccola dose di vitamina B₆ e B₁₂ (Tab. II). La somministrazione di folati comporta un miglioramento del rapporto AdoMet/AdoHcy in pazienti in emodialisi, ciò indica che il blocco delle transmetilazioni viene ridotto dalla terapia (25). Uno studio sugli effetti della vitamina B₁₂ in aggiunta alla terapia con folati ad alte dosi ha dimostrato che questa strategia può essere efficace nel normalizzare i livelli di Hcy

(40). Questi studi vanno però confermati su scala più ampia.

I folati sono importanti nella crescita cellulare, sono infatti necessari alla timidilato sintetasi nella sintesi del DNA. È stato dimostrato da diversi studi che la carenza di folati sia implicata nella carcinogenesi di diversi tumori, ed in particolare il cancro coloretale. D'altra parte, però i folati essendo appunto necessari alla crescita cellulare potrebbero stimolare o coadiuvare la crescita di alcuni tumori già presenti, in atto, soprattutto quelli delle linee mielolinfomonocitarie. Bisogna perciò, a nostro avviso, escludere la presenza di tumori prima di intraprendere la terapia, ed interromperla se necessario.

Per quanto riguarda le altre molecole come la serina, e la betaina è stato dimostrato che non sono efficaci in questi pazienti.

Diversi sono gli studi che sostengono che una maggiore efficienza dialitica possa essere alla base di una più efficace strategia atta a normalizzare i livelli di Hcy. Procedure dialitiche più efficienti porterebbero ad una più efficace rimozione delle tossine uremiche e dell'Hcy. La dialisi ad alto flusso è più efficace in confronto a quella a basso flusso, mentre risultati eccellenti si sono avuti con la dialisi superflusso. In questo caso è probabile che la maggiore efficacia sia dovuta sia alla rimozione dell'albumina stessa, poiché la maggior parte dell'Hcy circolante è legata all'albumina, che alla rimozione delle tossine uremiche (41). In ogni caso, i risultati migliori si sono avuti con la dialisi notturna quotidiana (42).

Una strategia adottata recentemente consiste nell'utilizzo di N-acetilcisteina, infusa in soluzione glucosata, per tutta la durata della sessione dialitica, con lo scopo di spiazzare l'Hcy dai siti di *binding* alle proteine. Ciò comporterebbe un aumento dell'Hcy libera che quindi sarebbe più facilmente dializzabile. La concentrazione di Hcy totale si normalizza alla fine della seduta dialitica, e si mantiene bassa per due giorni dopo la dialisi (43). Gli Autori hanno anche notato una riduzione della pressione differenziale e (dai risultati dell'analisi fotopletismografica effettuata durante tutta la dialisi su di un'arteria periferica) un miglioramento della funzione endoteliale. Poiché l'N-acetilcisteina ha proprietà antiossidanti (essa promuove la formazione del glutathione, ed esplica effetti vasodilatatori), è possibile che gli effetti sulla funzione endoteliale siano svincolati dalla riduzione dell'Hcy. Eccetto sporadici episodi di nausea e vomito in alcuni pazienti, è generalmente ben tollerata per via sistemica. Tuttavia, nonostante i promettenti risultati dello studio citato, l'efficacia e la sicurezza a lungo termine della somministrazione endovenosa di N-acetilcisteina devono essere confermate da ulteriori studi. Infatti, in uno studio precedente, la somministrazione per via orale di N-acetilcisteina ha ridotto, senza raggiungere livelli di significatività, i livelli di Hcy nei pazienti in dialisi (44).

Come già menzionato, l'impatto della terapia per la prevenzione cardiovascolare non è stato estesamente valutato.

Supplementi di acido folico, al differenza che in soggetti sani e con ipercolesterolemia, non ha comportato il miglioramento di vari parametri di funzionalità endoteliale in pazienti con vari livelli di IRC. Lo studio di Wrone et al. già citato, è negativo, per quanto riguarda la mortalità in generale, della terapia con folati. In questo studio, però, mancano il placebo e i dati relativi alla sola mortalità cardiovascolare (una riduzione della mortalità dovuta ai folati può essere stata oscurata da un aumento di questa dovuta a malnutrizione, per esempio) e non può essere considerato conclusivo.

In uno studio non controllato, la somministrazione endovenosa di MTHF comporta una riduzione dell'Hcy ed un miglioramento della funzione endoteliale in pazienti in emodialisi convettiva (45).

Per concludere, la nostra ignoranza sulle cause dell'iperomocisteinemia nell'IRC è probabilmente alla base dell'insuccesso nel normalizzare i livelli di Hcy nei pazienti in dialisi. Inoltre, la natura della malattia cardiovascolare in questi pazienti è particolarmente complessa, è da considerare per esempio che nel sistema cardiovascolare è presente solo la via della rimetilazione, nel metabolismo dell'Hcy. Ci si aspetta dei risultati affidabili nel valutare l'impatto della terapia solo da studi randomizzati come il FAVORIT (6).

Test di verifica

1) Livelli ematici più bassi di omocisteina nell'uremia possono essere dovuti a:

- Difetto di produzione
- Malnutrizione
- Elevato prodotto calcio fosforo
- Disfunzione endoteliale
- Aumento del *pool* intracellulare

2) La terapia dell'iperomocisteinemia nell'uremia si basa sulla somministrazione di:

- Betaina
- Serina
- Vitamina D
- Folati e vitamine B₆ e B₁₂, possibilmente acetilcisteina
- Vitamina E

3) Tra i meccanismi di tossicità dell'omocisteina ci sono:

- Inibizione della Na/K ATPasi
- Ipometilazione, omocisteinilazione delle proteine
- Attivazione dell'angiotensina II
- Inibizione delle calpaine
- Stimolazione della produzione di PTH.

La risposta corretta alle domande sarà disponibile sul sito internet www.sin-italy.org/gin e in questo numero del giornale cartaceo dopo il Notiziario SIN

Riassunto

L'insufficienza renale cronica (IRC) si associa molto frequentemente ad un aumento dei livelli plasmatici di omocisteina (Hcy), che può essere considerata una nuova tossina uremica. Gli studi sull'Hcy presero l'avvio con la descrizione dell'omocistinuria, una malattia ereditaria, caratterizzata da elevati livelli di Hcy plasmatica ed elevata mortalità per eventi cardiovascolari prematuri. Successivamente, anche nella popolazione generale e nell'IRC è stato descritto che l'iperomocisteinemia si associa ad eventi cardiovascolari. L'Hcy è un amminoacido solforato, che deriva dall'amminoacido essenziale metionina. La metionina viene prima condensata con l'ATP a formare S-adenosilmetionina (AdoMet), che viene utilizzata come donatore di metili nelle reazioni di transmetilazione. Dal prodotto demetilato, S-adenosilomocisteina (AdoHcy), si origina l'Hcy. L'Hcy esplica la propria azione tossica sull'endotelio, sulle piastrine, e sulla cascata coagulativa, attraverso diversi meccanismi d'azione. I valori di Hcy si elevano quando la funzione renale declina e progredisce verso l'uremia; le cause di ciò non sono ancora chiare. Studi su

modelli umani dimostrano che l'estrazione metabolica renale di Hcy dipende dal flusso plasmatico renale; a ciò si aggiungerebbe un'alterazione del metabolismo extrarenale dell'Hcy, dipendente dalla tossicità uremica. Tra le conseguenze dell'iperomocisteinemia nell'uremia vi è l'ipometilazione delle proteine, con inibizione di una reazione di riparazione proteica; l'ipometilazione del DNA, accompagnata da un'alterazione dell'espressione allelica dei geni regolati attraverso la metilazione; l'omocisteinilazione delle proteine. Inoltre, in questa rassegna verrà trattato il problema della cosiddetta "epidemiologia inversa", e le possibili strategie terapeutiche atte a normalizzare i livelli di Hcy nei pazienti uremici.

Indirizzo degli Autori:
Dr.ssa Alessandra Perna
Prima Divisione di Nefrologia
Seconda Università degli Studi di Napoli
Via Pansini, 5 Edificio 17
80131 Napoli
e-mail: alessandra.perna@unina2.it

Bibliografia

1. McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of atherosclerosis. *Am J Pathol* 1969; 56:111-28.
2. Wilcken DEL, Wilcken B. The pathogenesis of coronary artery disease. A possible role for methionine metabolism. *J Clin Invest* 1976; 57:1079-82.
3. Homocysteine studies collaboration. Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke. *JAMA* 2002; 288: 2015-22.
4. Casas JP, Bautista LE, Smeeth L, Sharma P, Hingorani AD. Homocysteine and stroke: evidence on a causal link from mendelian randomization. *Lancet* 2005; 365: 224-32.
5. Toole JF, Malinow MR, Chambless LE, et al. Lowering homocysteine in patients with ischemic stroke to prevent recurrent stroke, myocardial infarction, and death: the Vitamin Intervention for Stroke Prevention (VISP) randomized controlled trial. *JAMA* 2004; 291: 565-75.
6. Friedman AN, Rosenberg IH, Selhub J, et al. Hyperhomocysteinemia in renal transplant recipients. *Am J Transplant* 2002; 2: 308-13.
7. Mallamaci F, Zoccali C, Tripepi G, et al. Hyperhomocysteinemia predicts cardiovascular outcomes in hemodialysis patients. *Kidney Int* 2002; 61: 609-14.
8. Bostom AG, Lathrop L. Hyperhomocysteinemia in end-stage renal disease: prevalence, etiology, and potential relationship to arteriosclerotic outcomes. *Kidney Int* 1997; 52: 10-20.
9. Perna AF, Castaldo P, Ingrosso D, De Santo NG. Homocysteine, a new cardiovascular risk factor, is also a powerful uremic toxin. *J Nephrol* 1999; 12: 230-40.
10. Zappia V, Zydek-Cwick CR, Shlenk F. The specificity of S-adenosylmethionine derivatives in methyl transfer reactions. *J Biol Chem* 1969; 244: 4499-505.
11. Clarke R, Daly L, Robinson K, et al. Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. *N Engl J Med* 1991; 324:1149-55.
12. Klerk M, Verhoef P, Clarke R, et al. MTHFR C677T polymorphism and risk of coronary heart disease: a meta-analysis. *JAMA* 2002; 288: 2023-31.
13. Casas PJ, Bautista LE, Smeeth L, Sharma P, Hingorani AD. Homocysteine and Stroke. Evidence on a casual link from mendelian randomisation. *Lancet* 2005; 365: 224-32.
14. Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *Am J Kidney Dis* 1998; 32 (5Suppl 3): S112-9.
15. Refsum H, Helland S, Ueland PM. Radioenzymic determination of homocysteine in plasma and urine. *Clin Chem* 1985; 31: 624-8.
16. Guttormsen AB, Mansoor AM, Fiskerstrand T, Ueland PM, Refsum H. Kinetics of plasma homocysteine in healthy subjects after peroral homocysteine loading. *Clin Chem* 1993; 39: 1390-7.
17. Perna AF, Capasso R, Lombardi C, Ancanfora F, Satta E, Ingrosso D. Hyperhomocysteinemia and macromolecule modifications in uremic patients. *Clin Chem Lab Med*, 2005; 43:1032-8.
18. Loerher FMT, Angst CP, Brunner FP, Haefeli We, Fowler B. Evidence for disturbed S-adenosylmethionine/S-adenosylhomocysteine ratio in patients with end-stage renal failure: a cause for disturbed methylation reactions? *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13: 656-661.
19. Van Guldener C, Donker AJM, Jakobs C, Teerlink T, de Meer K, Stehouwer CDA. No net renal extraction of homocysteine in fasting humans. *Kidney Int* 1996; 54:166-99.
20. Mitch WE, Collier VU, Walsler M. Creatinine metabolism in chronic renal failure. *Clin Sci* 1980; 58: 327-35.
21. Guttormsen AB, Ueland PM, Svarstad E, Refsum H. Kinetic basis of hyperhomocysteinemia in patients with chronic renal failure. *Kidney Int* 1997; 52: 495-502.
22. Stam F, van Guldener C, ter Wee PM, et al. Homocysteine clearance and methylation flux rates in health and end-stage renal disease: association with S-adenosylhomocysteine. *Am J Physiol Renal* 2004 Aug; 287 (2): F215-23.
23. Garibotto G, Sofia A, Saffiotti S, et al. Inter-organ exchange of aminothiols in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 284: E757-763.
24. Perna AF, Ingrosso D, Zappia V, Galletti P, Capasso G, De Santo

- NG. Enzymatic methyl esterification of erythrocyte membrane proteins is impaired in chronic renal failure. Evidence for high levels of the natural inhibitor S-adenosylhomocysteine. *J Clin Invest* 1993; 91: 2497-503.
25. Perna AF, Ingrosso D, De Santo NG, Galletti P, Zappia V. Mechanism of erythrocyte accumulation of methylation inhibitor S-adenosylhomocysteine in uremia. *Kidney Int* 1995; 47: 247-53.
 26. Perna AF, Ingrosso D, Satta E, et al. Plasma protein aspartyl damage is increased in hemodialysis patients: studies on causes and consequences. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 2747-54.
 27. Ingrosso D, Cimmino A, Perna AF, et al. Folate treatment and unbalanced methylation and changes of allelic expression induced by hyperhomocysteinemia in patients with uremia. *Lancet* 2003; 361: 1693-9.
 28. Jakubowski H. Protein homocysteinylation: possible mechanism underlying pathological consequences of elevated homocysteine levels. *FASEB J* 1999; 13: 2277-83.
 29. Perna AF, Satta E, Acanfora F, Lombardi C, Ingrosso D, De Santo NG. Increased plasma protein homocysteinylation in hemodialysis patients. *Kidney Int*, 2006; 69: 869-76.
 30. Kalantar-Zadeh K, Block G, Humphreys MH, Kopple JD. Reverse epidemiology of cardiovascular risk factors in maintenance dialysis patients. *Kidney Int* 2003; 63: 793-808.
 31. Suliman ME, Stenvinkel P, Heimbürger O, et al. Plasma sulfur amino acids in relation to cardiovascular disease, nutritional status, and diabetes mellitus in patients with chronic renal failure at start of dialysis therapy. *Am J Kidney Dis*, 2002; 40: 480-8.
 32. Wrono EM, Hornberger JM, Zehnder JL, et al. Randomized trial of acid folic prevention of cardiovascular events in end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 442-53.
 33. Togawa T, Sengupta S, Chen H et al. Mechanism for the formation of protein-bound homocysteine in human plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 277 (3): 668-74.
 34. Bostom AG. Homocysteine: "expensive creatinine" or important modifiable risk factor for arteriosclerotic outcomes in renal transplant recipients? *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 149-51.
 35. Bostom AG, Selhub J, Jacques PF, et al. Power shortage: Clinical trials testing the "homocysteine hypothesis" against a background of folic acid-fortified cereal grain flour. *Ann Intern Med* 2001; 135: 133-7.
 36. Wilcken DEL, Wilcken B. The natural history of vascular disease in homocystinuria and the effects of treatment. *J Inher Metab Dis* 1997; 20: 295-300.
 37. Sunder-Plassmann G, Födinger M, Buchmayer H, et al. Effect of high dose folic acid therapy on hyperhomocysteinemia in hemodialysis patients: results of the Vienna multicenter study. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 1106-16.
 38. Massy ZA. Potential strategies to normalize the levels of homocysteine in chronic renal failure patients. *Kidney Int* 2003; 63: S134-6.
 39. Bostom AG, Shemin D, Bagley P, et al. Controlled comparison of L-5-methyltetrahydrofolate versus folic acid for the treatment of hyperhomocysteinemia in hemodialysis patients. *Circulation* 2000; 101 (24): 2829-32.
 40. Herbert V, Bigaudeau J. Call for endorsement of petition to the Food and Drug Administration to always add vitamin B-12 to any folate fortification or supplementation. *Am J Clin Nutr* 1997; 65: 572-3.
 41. Koyama K, Usami T, Takeuchi O, Morozumi K, Kimura G. Efficacy of methylcobalamin on lowering total homocysteine plasma concentration in haemodialysis patients receiving high-dose folic acid supplementation. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17: 916-22.
 42. Friedman AN, Bostom AG, Levey AS, et al. Plasma total homocysteine levels among the patients undergoing nocturnal versus standard hemodialysis. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13(1): 265-8.
 43. Scholtz A, Ringer C, Beige J, et al. Acetylcysteine reduces plasma homocysteine concentration and improves pulse and endothelial function in patients with endstage renal failure. *Circulation* 2004; 109(3): 369-74.
 44. Friedman AN, Bostom AG, Laliberty P, et al. The effects of N-acetylcysteine on plasma total homocysteine levels in hemodialysis: a randomised, controlled study. *Am J Kidney Dis* 2003; 41 (2): 442-6.
 45. Bucciatti G, Raselli S, Baragetti I, et al. 5-methyltetrahydrofolate restores endothelial function in uraemic patients on convective haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17: 857-64.

Note aggiunte in bozza

Dalla stesura del presente articolo, diversi articoli sono stati pubblicati successivamente che andrebbero adeguatamente commentati.

Per quanto riguarda l'epidemiologia inversa, abbiamo lo studio di Ducloux et al. (1), accompagnato da un editoriale di Zoccali C, e Mallamaci F. Sono stati studiati prospetticamente, per 54 mesi, 459 pazienti in emodialisi, che venivano caratterizzati in base alla presenza o meno di infiammazione-malnutrizione cronica (chronic inflammation-malnutrition state, CIMS). Livelli di omocisteina > 30 micromolare si associavano ad un aumento significativo del rischio di mortalità globale (55%) nei pazienti senza CIMS, e non nei pazienti con CIMS. Risultati simili si sono avuti anche per quanto riguarda la mortalità cardiovascolare. Gli autori concludono che l'iperomocisteinemia è un forte fattore di rischio per mortalità globale e cardiovascolare nei pazienti emodializzati senza CIMS. Nei pazienti con CIMS, l'associazione viene mascherata dalla presenza di un fattore confondente importante come la combinazione di malnutrizione-infiammazione.

Inoltre, due studi d'intervento, per la precisione di prevenzione secondaria, sono stati pubblicati sul *New Engl J Med* (2, 3). Uno è il già menzionato NOR-VIT, per la prevenzione del reinfarto del miocardio, e l'altro, l'HOPE-2, in pazienti con malattia vascolare o diabete. Ambedue sono negativi, nel senso che non vi è un beneficio in termini di malattia cardiovascolare della terapia con folati, anche se per ambedue vi è una tendenza verso una minore incidenza di ictus.

A prescindere dai diversi problemi che ciascuno studio presenta (per esempio, i pazienti non avevano iperomocisteinemia, il follow-up era troppo breve, ecc.), ed il fatto che si tratta comunque di prevenzione secondaria, è sempre

possibile l'ipotesi che l'iperomocisteinemia sia solo un marcatore di malattia. D'altro canto, bisogna considerare che la terapia con folati presenta molti effetti (i folati sono necessari nella sintesi del DNA, ecc.). Per esempio, proprio per tali effetti, si sospetta che i folati possano essere implicati, non già nella carcinogenesi, ma nella proliferazione tumorale, quando il tumore sia in atto, oppure nella occlusione di stent coronarici, ecc. Quindi, assumere che l'unico effetto della terapia con folati sia la riduzione dell'omocisteinemia non è corretto. La terapia ideale per ridurre l'omocisteinemia, esente da altri effetti, non è stata ancora scoperta. Come bene espresso nell'editoriale di Loscalzo, bisogna stare attenti alle esemplificazioni troppo spinte, quando si tratta di problemi complessi (4). Inoltre, rimane sempre la possibilità che più che l'omocisteina di per se, siano invece gli effetti sull'espressione genica o per esempio l'omocisteinilazione delle proteine a rappresentare il vero colpevole (5).

1. Ducloux D, Klein A, Kazory A, Devillard N, Chalopin JM. Impact of malnutrition-inflammation on the association between homocysteine and mortality. *Kidney Int* 2006; 69: 331-5.
2. Bønaa KH, Njølstad I, Ueland PM, et al. Homocysteine lowering and cardiovascular events after acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006; 354: 1578-88. Epub 2006 Mar 12.
3. The Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) 2 Investigators. Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in vascular disease. *N Engl J Med* 2006; 354.
4. Loscalzo J. Homocysteine trials—Clear outcomes for complex reasons. *N Engl J Med* 2006; 354: 1629-32.
5. Jacobsen DW. Homocysteine targeting of plasma proteins in hemodialysis patients. *Kidney Int* 2006; 69: 787-9.